流行病学调查

精氨酸加压素基因rs66818855A/G和rs1078152C/T在广西健康人群中的分布

向　阳[1]，郭　静[2]，彭友帆[1]，蓝　艳[2]，黄华佗[1]，韦叶生[1]
右江民族医学院附属医院[1]检验科，[2]皮肤科，广西 百色 533000

摘要：目的 研究精氨酸加压素（AVP）基因单核苷酸多态性（SNP）位点rs66818855和rs1078152在广西健康人群中的分布，并对比不同种族间AVP基因型及等位基因频率分布的差别。**方法** 采用单碱基延伸的聚合酶链反应（PCR）技术和DNA测序法检测303例广西人AVP基因多态性，分析广西人群这两个位点的基因型和等位基因的分布频率，并与人类基因组计划公布的欧洲人、中国北京汉族人、日本人和非洲人的基因多态性分型数据比较，分析这5个人群人类的基因型及等位基因的分布频率。**结果** 在我国广西人群中存在AVP基因rs66818855和rs1078152多态性，分别有AA、AG、GG，CC、CT、TT三种基因型。与人类基因组计划公布的欧洲人、非洲人、日本人和中国北京人的单核苷酸多态性分型数据进行比较，AVP基因rs66818855、rs1078152位点基因型和等位基因频率在广西人群和欧洲人群的差异具有统计学意义（P均<0.01）；rs66818855位点等位基因频率与非洲人相比差异具有统计学意义（P<0.05）。**结论** 在广西地区人群中存在着AVP基因多态性。广西人群AVP基因多态性的分布与其他种族人群比较存在有差异，这种差异也许是与AVP相关的疾病在不同地区人群间发病率不同的原因之一，对于群体遗传学及人类学的研究可能起非常重要的作用。

关键词：精氨酸加压素；基因；单核苷酸多态性；种族

Distribution of single nucleotide polymorphisms of arginine-vasopressin gene in Guangxi healthy population

XIANG Yang[1], GUO Jing[2], PENG Youfan[1], LAN Yan[2], HUANG Huatuo[1], WEI Yesheng[1]
[1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China

Abstract: Objective To study the distribution of single nucleotide polymorphisms (SNP) of arginine-vasopressin (AVP) gene rs66818855 and rs1078152 in Chinese Guangxi healthy population in comparison with that in different ethnic populations. **Methods** Polymerase chain reaction-single base extension (PCR-SBE) and DNA sequencing were used to detect the allele and genotype frequencies of AVP gene among 303 Chinese healthy individuals in Guangxi, China, and the results were compared with the reported frequencies in 4 other populations (HapMap-CEU, HapMap-YRI, HapMap-JPT, and HapMap-HCB) from Human Genome Project group (HapMap) data. **Results** We found significant AVP gene polymorphisms in this Guangxi healthy population. The frequencies of allele and genotype of AVP gene rs66818855 and rs1078152 polymorphisms in this Guangxi population differed significantly from those in HapMap-CEU population (P<0.01), and allele frequencies of AVP gene rs66818855 polymorphism differed significantly from those in HapMap-YRI populations (P<0.05). **Conclusion** The distribution pattern of AVP gene polymorphisms in this Guangxi population is significantly different from that in other ethnic populations, which might account for the difference in the morbidity of AVP-related disease among different ethnic groups and may have important indications in the study of population genetics and anthropology.

Key words: arginine-vasopressin gene; gene polymorphisms; ethnics

精氨酸加压素（AVP）是由下丘脑产生的一种生物活性肽，具有调节渗透压、维持血流动力学稳定及调节中枢神经系统的生物学作用，是体内最重要的应激激素之一[1]。主要通过刺激下丘脑-垂体-肾上腺素（HPA）轴中的下丘脑进而在体内应激反应中发挥作用[2-3]。其与脑血管疾病、心血管疾病及肾脏等疾病的形成相关[4-6]。在脑卒中、心力衰竭、急性颅脑损伤等疾病中异常上升的血清AVP水平与疾病不良预后密切相关，提示AVP可能是某些疾病预后的重要标志物[7-9]。人类20号染色体p13区域存在编码AVP的基因，经人类基因组计划扫

收稿日期：2016-02-06
基金项目：国家自然科学基金（81260234，81560552）；2015年广西研究生创新课题（YCSZ2015221）；右江民族医学院校级课题（yy2015ky003）
Supported by National Natural Science Foundation of China (81260234, 81560552).

作者简介：向　阳，硕士研究生，E-mail: 495142897@qq.com
通信作者：韦叶生，博士，博士生导师，E-mail: wysh22@163.com

描发现AVP基因存在着变异及多态性。基因的改变与疾病发生、发展存在一定的相关性,AVP基因多态性与疾病相关性的研究鲜有报道,而关于AVP基因rs66818855和rs1078152多态性的研究尚未见报道。探究AVP基因多态性位点基因型及等位基因频率在广西健康人群中的分布,并与HapMap数据库公布的4个人群AVP基因分型数据进行比较,这会为我们研究基因在不同族群中的分布差异,进而探讨疾病在不同人群中的遗传规律提供理论依据。因此,我们采用单碱基延伸PCR的方法和DNA测序技术,对广西健康人群AVP基因的多态性进行研究,对于认识遗传因素在疾病中的作用具有重大意义。同时,分析其在广西正常人群中的分布,将为群体遗传学及人类学研究提供相应的遗传数据资料。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选自2015年4月~2015年8月右江民族医学院附属医院正常体检者,共303例,其中男181例、女122例,年龄25~80岁。实验室检查正常,除外心脑血管疾病及重要脏器疾病者。所有的研究对象均为广西自然人群,彼此之间无血缘关系,并且签署知情同意书,经伦理委员会批准。

1.2 基因组DNA提取

采集研究对象静脉血2 mL,加入EDTA-K2抗凝;选择改良碘化钠法提取基因组DNA,置于−70 ℃保存备用。

1.3 引物的设计与合成

根据NCBI上查找的AVP基因rs66818855和rs1078152序列,选择包含位点的序列并输入引物设计软件Primer3,得到用于特异性扩增rs66818855和rs1078152位点的PCR上下游引物,由上海天昊生物科技有限公司合成。其中,rs66818855上游引物5'-CCCGGAATCACTTAGCGCCATCA-3';下游引物5'-TTTCCTTCACCGGCGAGCGG-3';延伸引物为5'-TTTTTTTTTTTTGGCAGCGGAGGGGGCTGC-3'。rs1078152上游引物5'-GGTGCCAATTGAGAGTTCCAC-3';下游引物5'-GTAGGCCACGCGTCCTGTATGA-3';延伸引物为5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCCCGTAGAAG CCCACCC-3'。

1.4 PCR反应

AVP基因的PCR扩增反应体系为20 μL,其中含1xGC缓冲液Ⅰ(TAKARA)2.0 μL,2.5 mmoL Mg^{2+},0.2 mmol dNTP,上、下游引物各0.2 μmol/L,TaqDNA聚合酶1.0 U,DNA模板1 μL,余下体积用灭菌双蒸水补足。PCR产物用Qiagen公司的HotStarTaq进行多重PCR获取,PCR产物经虾碱酶(SAP,购自Promega)和外切酶Ⅰ(EXO I,购自Epicentre)纯化后用ABI公司的SNaPshot Multiplex kit进行延伸反应。延伸产物用虾碱酶(SNP,购自Promega)纯化后在ABI3130XL上样检测。SNP分型用GeneMapper4.0(Appliedbiosystems)来分析。

1.5 统计分析

根据测序的结果直接计算出AVP基因两个位点的基因型和等位基因的频率。Hardy-Weinberg遗传平衡检验,不同性别间多态性的比较及与NCBI数据库公布的4个人群(欧洲人群、非洲人群、日本人群及北京人群)AVP基因rs66818855和rs1078152位点分型结果进行比较,均采用SPSS13.0进行卡方检验计算。对比4个人群与广西人群AVP基因多态性差异,以$P<0.05$为差异有统计学意义;$P>0.05$认为符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律。

2 结果

2.1 AVP的基因型检测结果

AVP基因rs66818855和rs1078152的扩增产物大小分别为214 bp、305 bp。经ABI3130XL基因检测单核苷酸多态性(SNP)分型结果显示rs66818855和rs1078152位点均分别有AA、AG、GG, CC、CT、TT 3种基因型。经过基因测序后得到的数据进一步证实我们所检测到的结果(图1、2)。

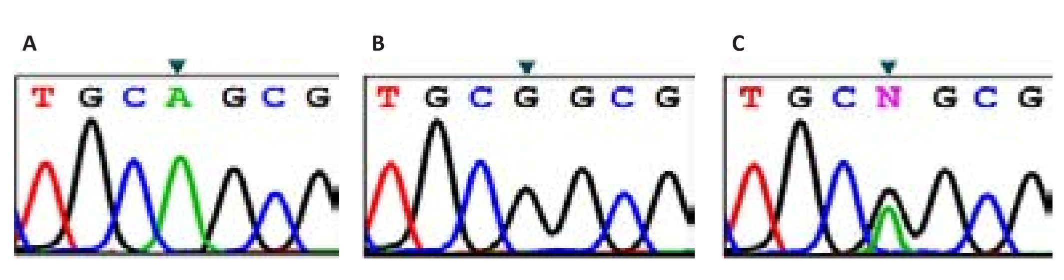


图1 *AVP*基因rs66818855A/G测序图

Fig.1 Sequencing map of genotypes of AVP gene rs66818855A/G polymorphism. Arrows in panels ***A***, ***B***, and ***C*** indicate AA, GG and AG genotypes, respectively.

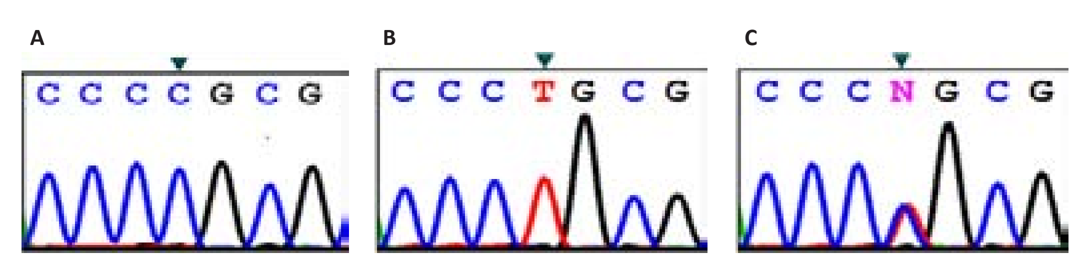


图2 AVP基因rs1078152C/T测序图(互补链)
Fig.2 Sequencing map of genotype of AVP gene rs1078152C/T polymorphism. Arrows in panels *A*, *B*, and *C* indicate CC, TT, and CT genotypes, respectively.

2.2 AVP基因多态性在广西人群中的分布

根据检测的结果直接计算AVP基因rs66818855和rs1078152这两个多态性位点的基因型和等位基因频率。经卡方检验，本次实验样本的AVP基因rs66818855、rs1078152基因型和等位基因频率符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律（P均>0.05），可知各基因型和等位基因频率已达到遗传平衡，具有明显的群体代表性。结果统计显示，广西人群中，AVP基因rs66818855、rs1078152两位点分别以AG，CT基因型多见，分别占43.2%和52.1%；G，C等位基因频率最高，各占58.9%和54.8%。各AVP基因多态性位点在男女间分布没有统计学差异（P均>0.05，表1、3）。

表1 rs66818855A/G在广西健康人群中的分布
Tab.1 Distribution of genotype and allele frequencies of AVP gene rs66818855A/G in Guangxi healthy population [n(%)]

rs	Gender	*n*	Genotype frequencies			Allele frequency	
			AA	AG	GG	A	G
rs66818855	Male	181	32 (17.7)	78 (43.1)	71 (39.2)	142 (39.2)	220 (60.8)
	Female	122	27 (22.1)	53 (43.4)	42 (34.5)	107 (43.9)	137 (56.1)
	Total	303	59 (19.5)	131 (43.2)	113 (37.3)	249 (41.1)	357 (58.9)

Genotype and allele frequencies of AVP gene showed no significant difference between male and female individuals the same group (P>0.05).

表2 不同种族及地区人群AVP基因rs66818855A/G多态性分布频率的比较
Tab.2 Comparison of frequency of AVP gene rs66818855A/G polymorphism among different ethic and regional groups

Group	*n*	Genotype frequencies			Allele frequency	
		AA	AG	GG	A	G
HapMap-CEU[a]	98	2 (2.0)	13 (13.1)	84 (84.8)	17 (8.6)	181 (91.4)
HapMap-HCB[b]	103	10 (9.7)	52 (50.5)	41 (39.8)	72 (35.0)	134 (65.0)
HapMap-JPT[b]	104	15 (14.4)	48 (46.2)	41 (39.4)	78 (37.5)	130 (62.5)
HapMap-YRI[b]	109	28 (25.7)	52 (47.7)	29 (26.6)	108 (49.1)	110 (50.9)
Guangxi people	303	59 (19.5)	131 (43.2)	113 (37.3)	249 (41.1)	357 (58.9)

[a]: Allele and genotype frequencies, both P<0.05, compared with the population in Guangxi; [b]: Allele and genotype frequencies, both P>0.05, compared with the population in Guangxi.

2.3 AVP基因多态性在不同种族人群间的比较

将广西人群的AVP基因rs66818855和rs1078152位点多态性分别与人类基因组计划公布的4个人群的单核苷酸多态性（SNP）分型数据进行比较，结果发现，AVP基因rs66818855、rs1078152两个位点基因型和等位基因频率在广西人群和欧洲人群的差异具有统计学

表3 rs1078152A/G在广西健康人群中的分布

Tab.3 Distribution of genotype and allele frequencies of AVP gene rs1078152A/G in Guangxi healthy population [*n*(%)]

RS	Gender	*n*	Genotype frequencies			Allele frequency	
			TT	CT	CC	T	C
rs1078152	Male	181	34 (18.8)	98 (54.1)	49 (27.1)	166 (45.9)	196 (54.1)
	Female	122	24 (19.7)	60 (49.2)	38 (31.1)	108 (44.3)	136 (55.7)
	Total	303	58 (19.1)	158 (52.1)	87 (28.7)	274 (45.2)	332 (54.8)

Genotype and allele frequencies of AVP gene showed no significant difference between male and female individuals the same group (P>0.05).

意义(基因型χ^2分别为68.30和50.06,等位基因χ^2分别为71.22和48.66,P均<0.01),rs66818855位点等位基因频率与非洲人相比差异具有统计学意义(χ^2为4.67,P<0.05,表2、4)。

表4 不同种族及地区人群AVP基因rs1078152A/G多态性分布频率的比较

Tab.4 Comparison of the frequency of AVP gene rs1078152A/G polymorphism among different ethic and regional groups

Group	*n*	Genotype frequencies			Allele frequency	
		TT	CT	CC	T	C
HapMap-CEU[a]	99	52 (52.5)	42 (42.4)	5 (5.1)	146 (73.7)	52 (26.3)
HapMap-HCB[b]	103	26 (25.2)	57 (55.3)	20 (19.4)	109 (52.9)	97 (47.1)
HapMap-JPT[b]	104	26 (25.0)	56 (53.8)	22 (21.2)	108 (51.9)	100 (48.1)
HapMap-YRI[c]	109	19 (17.4)	57 (52.3)	33 (30.3)	95 (43.1)	123 (56.9)
Guangxi people	303	58 (19.1)	158 (52.1)	87 (28.7)	274 (45.2)	332 (54.8)

[a]: Allele and genotype frequencies, both P<0.05, compared with the population in Guangxi; [b]: Allele and genotype frequencies, both P>0.05, compared with the population in Guangxi; [c]: Allele frequencies, P<0.05, compared with the population in Guangxi.

3 讨论

精氨酸加压素是下丘脑-垂体-肾上腺素(HPA)轴的重要组成部分,在机体生理活动中起重要的调节作用[10-12]。既往的研究表明,AVP本身及其受体基因的多态性位点可能参与相关疾病的发生[13-15]。目前,关于AVP基因rs66818855和rs1078152多态性的研究在国内外尚未见报道。首先探讨不同地区,不同人群间正常人群AVP基因多态性及其分布的特点,可为我们提供不同地区人群的遗传背景资料,进而为我们研究相关疾病在不同地区人群中的发病情况提供遗传数据支持。

本次研究采用了单碱基延伸PCR的方法和基因测序的技术检测了广西地区正常人群中AVP基因rs66818855和rs1078152两个位点的多态性分布情况,并对比Hapmap上公布的四个人群(欧洲人群、非洲人群、日本人群和北京人群)的SNP分型数据,分析了5个人群的AVP基因rs66818855和rs1078152位点的基因型和等位基因频率。结果显示同一SNP位点基因型和等位基因的分布在不同人群间存在有差异,不同SNP位点在不同地区人群中分布的差异并不一致。随着全人类基因扫描计划的进行,逐步认识到SNP位点在不同人群中的分布中存在差异,而不同地区人群中SNP位点分布的差异是造成不同地区人群遗传背景不同的原因之一,结合现有的研究,具有不同遗传背景的人群,对疾病的易感性也存在差异,Vazgiourakis等[16]研究发现CD40基因rs4810485与希腊人和土耳其人SLE的发病有关,而Piotrowski等[17]却发现rs4810485与波兰人SLE的发病没有相关性。广西人与北京人,日本人均属黄种人,遗传分类上同属东亚人群,亲缘关系近,其多态性分布相近;而广西人与欧洲、非洲人亲缘关系远,多态性分布差异较大。此外,我国人口众多,地区差异较大,遗传背景复杂。广西地处西南亚热带地区,地理环境,生活方式与北京、日本人存在较大差异。而多态性的分布差异除了与人种相关外,不同地区地理环境、饮食习惯及生活方式造成的后天因素,亦会导致基因多态性分布的差异[18],进而导致相关疾病在不同人群中的发病情况不同。

因此,分析我国广西健康人群AVP基因rs66818855、rs1078152位点多态性及其在不同地区人群中的分布,有助于加深我们对群体遗传学的认识,阐明基因改变与疾病发生、发展的联系,为临床上研究不同地区和人群AVP基因相关的多种疾病提供相应的遗传学数据。

参考文献:

[1] Singh Ranger G. The physiology and emerging roles of antidiuretic hormone[J]. Int J Clin Pract, 2002, 56(10): 777-82.

[2] Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response[J]. Annu Rev Physiol, 2005, 67(5): 259-84.

[3] Goncharova ND. Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2013, 24(2): p. 26.

[4] Van Haren RM, Thorson CM, Ogilvie MP, et al. Vasopressin for cerebral perfusion pressure management in patients with severe traumatic brain injury: preliminary results of a randomized controlled trial[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2013, 75(6): 1024-30; discussion 1030.

[5] Chen X, Lu G, Tang K, et al. The secretion patterns and roles of cardiac and circulating arginine vasopressin during the development of heart failure[J]. Neuropeptides, 2015, 51(6): 63-73.

[6] Boertien WE, Meijer E, Li J, et al. Relationship of copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin, with change in total kidney volume and GFR decline in autosomal dominant polycystic kidney disease: results from the CRISP cohort[J]. Am J Kidney Dis, 2013, 61(3): 420-9.

[7] Urwyler SA, Schuetz P, Fluri F, et al. Prognostic value of copeptin: one-year outcome in patients with acute stroke[J]. Stroke, 2010, 41 (7): 1564-7.

[8] Morawiec B, Kawecki D. Copeptin: a new marker in cardiology[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2013, 14(1): 19-25.

[9] Yang DB, Yu WH, Dong XQ, et al. Plasma copeptin level predicts acute traumatic coagulopathy and progressive hemorrhagic injury after traumatic brain injury[J]. Peptides, 2014, 58(8): 26-9.

[10] Zhao XY, Wu CF, Yang J, et al. Effect of arginine vasopressin on the cortex edema in the ischemic stroke of Mongolian gerbils[J]. Neuropeptides, 2015, 51(7): 55-62.

[11] Mironova E, Chen Y, Pao AC, et al. Activation of ENaC by AVP contributes to the urinary concentrating mechanism and dilution of plasma[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(3): F237-43.

[12] Manaenko A, Fathali N, Khatibi NH, et al. Post-treatment with SR49059 improves outcomes following an intracerebral hemorrhagic stroke in mice[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(6): 191-6.

[13] Moons WG, Way BM, Taylor SE. Oxytocin and vasopressin receptor polymorphisms interact with circulating neuropeptides to predict human emotional reactions to stress[J]. Emotion, 2014, 14 (3): 562-72.

[14] Levran O, Randesi M, Li Y, et al. Drug addiction and stress-response genetic variability: association study in African Americans [J]. Ann Hum Genet, 2014, 78(4): 290-8.

[15] Malik AI, Zai CC, Berall L, et al. The role of genetic variants in genes regulating the oxytocin-vasopressin neurohumoral system in childhood-onset aggression[J]. Psychiatr Genet, 2014, 24(5): 201-10.

[16] Vazgiourakis VM, Zervou MI, Choulaki C, et al. A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(12): 2184-90.

[17] Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, et al. Single nucleotide polymorphism of CD40 region and the risk of systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2013, 22(3): 233-7.

[18] 柯金坤, 姚宇峰, 刘舒媛, 等. 不同海拔高度低氧环境差异对EPAS1基因多态性的影响[J]. 中华遗传学杂志, 2011, 28(5): 583-8.

(编辑:孙昌朋)